

**Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen
über Hirnantikörper in Humanseren
und ihre Beziehung zur multiplen Sklerose**

Alexander von Schmädel

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0110

Aus dem Max Planck Institut für Psychiatrie

Direktor: Prof. Dr. med. G. Peters

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über Hirnanti-
körper in Humanseren und ihre Beziehung zur multiplen Sklerose.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alexander von Schmädell

aus

Fürstenfeldbruck

1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. G. Peters
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Brendel
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	10. 9. 1974



I n h a l t :

Einleitung

Material.

Seren.

IgG-Fraktion

Methoden.

A. Immunfluoreszenz

Durchführung:

Kontrollen:

1. Block des Antigens.
2. Block des Antiserums.
3. Ausschluß unspezifischer Einflüsse durch das Konjugat.
4. Ausschluß speziesspezifischer Unterschiede bei Verwendung von tierischem Gewebe und Seren vom Menschen.

Beurteilung der Fluoreszenz:

B. Histologie.

Phasenkontrastmikroskopie:

Histologische Färbung:

C. IgG-Konzentrationsbestimmung.

Ergebnisse.

1. Untersuchung von 213 Humansenen auf Hirnantikörper vom IgG-Typ.
Zielstrukturen der Hirnantikörper.
Verteilung der Myelinantikörper in den einzelnen Krankheitsgruppen.
2. Semiquantitative Bestimmung der Antikörpertiter positiver Seren.
3. Abbindung von Kaninchenhyperimmunseren gegen basisches Protein.
4. Untersuchung von unverdünnten Seren gesunder Kaninchen.
5. Ausschluß unspezifischer Einflüsse durch das Konjugat.
6. Ausschluß spezifischer Unterschiede bei der Verwendung vom tierischem Gewebe und Seren vom Menschen.
7. Blocktest.
8. Absorptionsversuche.

9. Phasenkontrastmikroskopie.
10. Histologie.
11. IgG-Isolation.
12. Partigen.

Diskussion.

A. Myelinantikörper und multiple Sklerose.

B. Spezifität und Unspezifität der Nachweismethode.

Literatur.

E i n l e i t u n g

Über humorale Antikörper (AK) gegen Gehirngewebe berichteten erstmals Sachs und Steiner (1934), die 289 Seren von Patienten mit multipler Sklerose (MS) mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion (KBR) untersuchten. Als Antigen verwendeten sie einen alkoholischen Extrakt normaler menschlicher Gehirne sowie MS-Gehirne und fanden in 42% der Seren positive Resultate. Seidem gibt es in der Literatur zahlreiche Untersuchungen mit den verschiedensten serologischen Methoden über das Vorkommen von Hirnantikörpern in Serum und Liquor von MS-Patienten. Eine tabellarische Übersicht geben McAlpine, Lumsden, Acheson (1968) und Ritzel, Wüthrich und Rieder (1963). Bei einem Vergleich der einzelnen Autoren kann man eine enorme Schwankungsbreite der positiven und negativen Ergebnisse feststellen. So sind bei Frick (1954) 88% von 16 Seren positiv bei Macleod et al. (1962) dagegen 0% von 110, bei Verwendung derselben Methode. Außerdem wurde bei den erwähnten Untersuchungen mit serologischen Methoden wie KBR, Ouchterlony usw. immer ein Konglomerat von Gehirnproteinen verwendet. Eine klare Charakterisierung des Antigens war somit nicht möglich.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Hirnantikörper, die mit verschiedenen Strukturen des Nervengewebes reagieren, bieten Gewebekulturen. So fanden Berg und Küllen (1962) in Gliakulturen einen zytotoxischen Effekt bei 27 von 42 MS-Seren, allerdings auch bei neun von 17 gesunden Personen. Bornstein und Appel (1965), Hughes und Field (1967) und McAlpine et al. (1968) konnten nach Zugabe von MS-Seren zu Kulturen mit Myelin eine Destruktion der Markscheiden in einem Teil der Fälle nachweisen.

Dowling et al. (1968) isolierten zwei komplementbindende, demyelinisierende Antikörper aus Seren von MS-Patienten, und konnten sie der IgM und IgG Klasse der Immunglobuline zuordnen.

Die Autoren machen aber auch auf die großen Ungenauigkeiten und somit auf die Unspezifität der Methode aufmerksam. Denn fast alle Seren zeigen generell zytotoxische Effekte, besonders, wenn sie in junge Kulturen gegeben werden, und es ist dann schwierig, eindeutig positive Resultate herauszuarbeiten.

Genauere Aussagen über die Strukturen gegen die sich die Hirnantikörper richten sind mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenzsmethode nach Weller und Coons (1954) möglich.

Allerand und Yahr (1964) testeten mit dieser Methode 41 Seren und 33 Liquores von Patienten mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen und 15 Seren und sechs Liquores von Normalpersonen. Dazu kamen noch fünf Seren von gesunden Rhesusaffen. Die Autoren fanden, daß alle Seren, sowohl Patienten wie Affenserum zu einer Fluoreszenz der Myelinscheiden und Gliazellen in der gesamten weißen Substanz führen. Sie vermuten deshalb zuerst, daß es sich hier vielleicht nicht um Autoantikörper, sondern um eine unspezifische Abbindung von Gammaglobulin handeln könnte. Da eine solche Fluoreszenz aber mit anderen Proteinfractionen des Serums oder mit dem Konjugat allein nicht zu sehen war, nahmen sie dann doch an, daß mehr als eine unspezifische Interaktion vorliegt.

Wilkinson und Zeromski berichteten 1965 über antineuronale Antikörper, die sie bei drei von fünf Seren von Patienten mit sensorischer karzinomatöser Neuropathie feststellten. Antikörper gegen Myelin werden nicht erwähnt. Weitere drei Seren von Patienten mit karzinomatöser Neuropathie eines anderen Typs und 12 Seren von Normalpersonen ergaben negative Resultate.

Edgington und Dalessio, die 1970 erstmals eine repräsentativere Anzahl von Humenserum immunfluoreszenzoptisch untersuchten, fanden dagegen sogar bei 50 Seren

von Normalpersonen in 88% und bei 15 MS-Seren in 100% der Fälle Antikörper gegen Myelin.

Die Ergebnisse von Allerand und Yahr (1964) und Edgington und Dalessio, (1970) besagen, daß entweder in nahezu jedem Humanserum Hirnantikörper vorkommen oder aber unspezifische Phänomene bei der Immunfluoreszenz dies vortäuschen. Wilkinson und Zeromski (1965) dagegen kommen auch zu negativen Resultaten und finden außerdem keine Antikörper gegen Myelin.

Wir haben nun versucht, durch eine Verbesserung der Spezifität der Immunfluoreszenzmethode mit Hilfe von Blocktesten, Phasenkontrastmikroskopie, normaler Histologie, IgG-Isolierung und IgG-Konzentrationsbestimmungen, eindeutigere Aussagen über Auftreten und Zielstrukturen von Hirnantikörpern in Humanseren zu bekommen.

Bei der oft als experimentelles Gegenstück zur multiplen Sklerose betrachteten experimentellen autoallergischen Enzephalomyelitis (EAE) kommt es zur Bildung von Antikörpern gegen das basische Protein der Markscheiden. Da das basische Protein für das einzige encephalitogene Agens gehalten wird (Eylar, 1970; Carnegie, 1971), sind wir der Frage nachgegangen, welche Bedeutung dem basischen Protein bei der multiplen Sklerose zukommt und ob nicht auch beim Menschen Antikörper gegen basisches Protein gebildet werden.

Weiterhin haben wir die Verteilung von Hirnantikörpern in Seren von Patienten mit multipler Sklerose, verschiedener anderer Krankheitsgruppen und von Normalpersonen untersucht und die Ergebnisse in Beziehung zur multiplen Sklerose gesetzt.

M a t e r i a l

Seren:

Auf die Anwesenheit von Antikörpern wurden insgesamt 213 Humanseren untersucht, die sich wie folgt gruppierten. MS- Patienten, neurologische Patienten, interne Patienten, schizophrene Patienten, Alkoholiker und gesunde Personen. Außerdem wurden noch drei Seren von gesunden Kaninchen und drei Seren von Kaninchen, die mit basischem Protein immunisiert worden waren, verwendet. Ferner wurden bei 10 MS-Seren, einem Serum einer Patientin mit Meningoencephalitis und einem stark positiven Serum einer gesunden Versuchsperson Verlaufsbeobachtungen durchgeführt. Im Abstand mehrerer Wochen wurde wiederholt Blut entnommen und fluo-reszenzoptisch untersucht. Der Antikörpertiter im Serum der gesunden Versuchsperson konnte über ein Jahr lang verfolgt werden.

IgG-Fraktion .

Aus dem Serum einer gesunden Versuchsperson wurde die IgG-Fraktion mittels Gel-Säule nach Joustra und Lundgren (1969) isoliert. Damit wollten wir feststellen, ob sich die IgG-Fraktion bei der Immunfluoreszenz wie das Gesamtserum verhält, oder ob einzelne Serumfaktoren das Immunfluoreszenzbild durch unspezifische Interaktionen verfälschen.

M e t h o d e n

A. Immunfluoreszenz

Durchführung

Eine indirekte Methode modifiziert nach Weller und Coons (Jentzsch, 1967; Nairn, 1969; Simon, 1971) wurde zum Nachweis der Hirnantikörper verwendet. Als Antigen dienten 7 μ dicke Kryostatschnitte aus Kleinhirn und Rückenmark (Quer- und Längsschnitte) eines gesunden Kanin-

chens, und Kryostatschnitte eines sechs Stunden nach Eintritt des Todes entnommenen, menschlichen Gehirns und Rückenmarks, die keine pathologischen Veränderungen aufwiesen. Die Gewebsschnitte wurden über Nacht 12 Stunden im Kühlschrank bei plus 4 Grad Celsius aufbewahrt, anschließend 30 Minuten luftgetrocknet und dann 30 Minuten in 96 %igem Äthylalkohol fixiert. Nach dreimal fünf Minuten Spülen in Phosphatpuffer (pH 7,2) wurden die zu untersuchenden Seren auf die Schnitte aufgetragen, bis der Schnitt völlig bedeckt war, meist genügte schon ein Tropfen, und 30 Minuten bei 37 Grad in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Abspülen in Phosphatpuffer, dreimal fünf Minuten, wurden die mit Serum beschichteten Schnitte mit dem entsprechenden Konjugat, z.B. mit fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-markiertem Anti-Human-Globulin-IgG-Serum vom Kaninchen (Microbiological), in der Verdünnung 1:20 bedeckt. Bei der Untersuchung der Kaninchenserum wurde FITC-markiertes Anti-Kaninchen-IgG-Serum von der Ziege 1:20 verwendet. Die Schnitte wurden wieder 30 Minuten bei 37 Grad in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend noch einmal dreimal fünf Minuten in Phosphatpuffer gespült und mit gepuffertem Glycerin (1:10) eingedeckt. Zuerst erfolgte eine qualitative Untersuchung. Die Seren wurden in unverdünntem Zustand auf Hirnantikörper hin überprüft. Bei positiven Seren wurden dann die Antikörpertiter mittels Verdünnungsreihen semiquantitativ bestimmt.

Die Untersuchungen wurden mit einem großen Zeiss Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Bei allen Versuchen wurde ein Filter Nr. 44 verwendet, der eine dunkelblaue Autofluoreszenz der Gewebe entstehen ließ. Vergrößerung 200-fach.

Kontrollen:

1. Block des Antigens:

In diesem Blocktest wurden die antigenen Determinanten des basischen Proteins, die im Schnitt anwesend sind, blockiert. In einer ersten Schicht wurde ein Anti-basisches-Protein(BP)-Hyperimmuns-
serum vom Kaninchen mit dem Titer 1:128, unverdünnt und in den Verdünnungen 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, auf die Schnitte gegeben und wie beschrieben inkubiert. Die zweite Schicht bildete zweimal ein unverdünntes Humanserum mit starker Fluoreszenz der Nerven-faserquerschnitte und in der dritten Gruppe ein fast negatives Serum.

Schema:

Schnittgewebe

Anti-BP-Serum

Humanserum

Anti-Human-IG-Konjugat 1 : 20

2. Block des Antiserums:

(Absorptionsversuche mit Myelin und Leberhomogenat)

Die untersuchten Humanseren und Anti-BP-Seren wurden vor Aufträufeln auf den Schnitt mit Myelin **blockiert**.

a) Absorption von 0,2ml Serum (=2,5mg IgG) mit 1,2mg Myelin:

Die durchschnittliche IgG-Konzentration des menschlichen Serum beträgt 1250mg/100ml. 0,1ml Serum enthalten dann 1,25mg IgG. Wenn man nun annimmt, daß in diesem Pool nur ein ganz geringer Teil als even-

tuell spezifischer Antikörper gegen Myelinproteine zu betrachten ist, genügen schon kleinste Myelinmengen für die Absorption. Es wurden jeweils 0,2ml Serum, also 2,5mg IgG, mit 150ul Myelin aus Kaninchengehirn (Proteinkonzentration: 8mg/ml), das heißt also mit 1,2mg Myelin eine Stunde bei Zimmertemperatur unter ständigem Schütteln inkubiert und dann bei 10000 Upm 10 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf Rückenmarksquerschnitte gegeben und nach der angegebenen Methode immunfluoreszenzmikroskopisch mit den nicht-absorbierten Seren verglichen.

- b) Absorption von 0,5 ml Serum (6,25mg IgG mit 3ml Myelin aus Schweinegehirn (Proteinkonzentration: 4,4 mg/ml), also mit 13,2mg Myelin.
- c) Absorption von 0,5 ml Serum mit 2-mal 100 mg Affenleberpulver: 0,5ml Serum wurden mit 100mg Leberhomogenat eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert, anschließend 10 Minuten bei 10000 Upm abzentrifugiert, und der Überstand nochmals mit 100 mg Leberpulver absorbiert. Vergleich: Leberabsorbierte Seren (in 2-mal 100mg Leberpulver) - Myelinabsorbierte Seren (in 13,2mg Myelin).
- d) Absorption eines stark positiven Humanserums mit sehr hohen Mengen von Myelin: 0,5ml Serum (6,25mg IgG wurden zweimal mit je 10 ml Myelin (4,4mg/ml), also mit insgesamt 88mg Myelin inkubiert. Ein Betrag, der immernoch unter der Menge des verwendeten Leberpulvers (200mg) liegt.

3. Ausschluß unspezifischer Fluoreszenz des Konjugates:

- a) die erste Schicht, das Human- oder Tierserum, wur-

den weggelassenen, und die Schnitte nur mit
1: 20 verdünnten Konjugat beschichtet.

b) Fixierte und gespülte Schnitte wurden ohne jede
weitere Behandlung eingedeckelt und untersucht.

4. Zum Ausschluß speziesspezifischer Unterschiede bei
der Verwendung von tierischem Gewebe und Seren von
Menschen, wurden 50 Humanseren auf Rückenmarksquer-
schnitten vom Menschen und vom Kaninchen verglei-
chend untersucht.

Beurteilung der Fluoreszenz:

Das FITC-Konjugat fluoresziert von mattem dunkel-
braungrün über homogen knallgrün bis leuchtend
hellgrün oder sogar hellgelb. Wichtig ist die Unter-
scheidung zwischen Anfärbung und Fluoreszenz. Bei
der Beurteilung der Fluoreszenz, und somit dem
Vorkommen von Antikörpern im Serum, wurde das Haupt-
augenmerk, eingedenk der Bedeutung von eventuellen
Antikörpern gegen Myelinproteine, auf die Nerven-
faserquerschnitte gelegt, und folgender Maßstab an-
gewandt.

- 0: keine Fluoreszenz oder
braun bis matt-dunkelgrüne Anfärbung
- + : Anfärbung stärker als 0 aber nicht mit
Sicherheit positiv, d.h. leuchtend grün.
- + : leuchtend grüne bis hellgelbe Fluoreszenz
- ++ : weitere Steigerung der Fluoreszenz

B Histologie:

Weil es bei Immunfluoreszenz häufig schwierig ist
die fluoreszierenden Zielstrukturen auch feingeweblich
zu identifizieren, haben wir zum Vergleich phasen-
kontrastmikroskopische Untersuchungen und histo-
logische Färbungen durchgeführt.

Mit Humanseren und Konjugat beschichtete und unbeschichtete Präparate von Rückenmarksquerschnitten wurden in einer Kombination von Immunfluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop untersucht.

Histologische Färbungen:

HE-Färbung, Markscheidenfärbung, Axonfärbung nach Bodian (Romeis, 1968), Axonfärbung nach Kelemen vergoldet und unvergoldet (Kelemen, 1965) wurden durchgeführt.

C. IgG-Konzentrationsbestimmung:

Bei sechs Humanseren wurde die IgG-Konzentration mit der Partigen-Methode (Behring) bestimmt. Mit dieser Methode versuchten wir herauszufinden, ob eventuell Beziehungen zwischen der IgG-Konzentration und den immunfluoreszenzoptischen Befunden bestehen.

Die eigene Objektivität bei der Beurteilung der Fluoreszenz wurde durch wiederholte Untersuchung derselben Seren an verschiedenen Tagen überprüft.

E r g e b n i s s e

1. Untersuchung von 213 Humanseren auf Hirnantikörper vom IgG-Typ (Tab. 1, Abb.1, Abb.2):

Zielstrukturen der Hirnantikörper:

Die Seren zeigten regelmäßig in unterschiedlicher Stärke eine Affinität für Myelin, das Zytoplasma von Motoneuronen und die Substantia gelatinosa im Hinterhorn.

Eine stark hellgelbe Fluoreszenz zeigten folgende Strukturen:

- a) die Markscheiden, denen unser besonderes Interesse galt.
- b) die Gefäße. Dieser Befund trat besonders bei den Alkoholikerseren in Erscheinung. Wir fanden bei elf von 15 untersuchten Alkoholikerseren eine zum Teil mehrfach positive Gefäßfluoreszenz (Abb. 3). Die Antikörper binden sich dabei an den Zellmembranen der Endothelien ab (Abb. 8). Bei den anderen Krankheitsgruppen fanden wir dagegen nur vereinzelt Antikörper gegen Gefäße.
- c) gelegentlich das Zytoplasma oder manchmal auch nur die Nissl-Substanz der Motoneurone.
- d) ebenfalls selten die Zellkerne. Zum Beispiel fanden wir bei einer Patientin mit pcP eine positive Kernfluoreszenz.
- e) sehr selten die Oligodendrozyten und Astrozyten.

Verteilung der Myelinantikörper in den einzelnen Krankheitsgruppen:

a) Multiple-Sklerose-Patienten:

Von den 56 untersuchten MS-Seren zeigten nur 13 eine positive Fluoreszenz der Markscheiden. Die positiven Befunde standen in keinerlei Beziehung zu klinischen Daten oder Verlaufsstadien der multiplen Sklerose.

b) Neurologische Patienten:

Von den 79 neurologischen Seren zeigten 15 eine positive Myelinfluoreszenz. Den positiven Befunden waren folgende Diagnosen zuzuordnen:

Kleinhirn-Brückenwinkel-Tumor, Epilepsie (2mal), Migräne, Querschnittmyelitis, andere neurologische Störungen (2mal), arterieller Anfall, Myopathie, Zerebralsklerose, subdurales Hämatom, Tumorverdacht, Diskusprolaps, Medialteilverschuß, neurotische Depression.

c) Interne Patienten:

Von den 35 untersuchten Seren zeigten 11 eine positive Myelinfluoreszenz. Den positiven Befunden waren folgende Diagnosen zuzuordnen:

Magenkarzinom, Alkoholdelirium, Mitralinsuffizienz, Leberzirrhose, Hypotonie, Dickdarmpolyp, Erythema nodosum, chronische Hepatitis, Myokarditis, Pyelonephritis und Schrumpfnieren.

d) Schizophrenie-Patienten:

Lediglich bei den Seren von Schizophrenen fanden wir eine auffallende Häufung positiver Befunde, die aber bei der geringen Fallzahl keine Signifikants beanspruchen können. Zehn von 17 Seren zeigten eine positive Myelinfluoreszenz.

e) Alkoholiker:

Von den 15 untersuchten Alkoholikerseren zeigten fünf eine positive Myelinfluoreszenz.

f) Gesunde Personen:

In dieser Gruppe fanden wir nur bei einer Testperson eine, allerdings stark, positive Myelinfluoreszenz. Anamnestisch ist vielleicht interessant, daß diese Testperson ein halbes Jahr vor Untersuchung des Serums gegen Pocken und Cholera geimpft wurde.

Zusammenfassend darf als wichtiger Befund die Tatsache angesehen werden, daß sich die Seren von MS-Patienten in keiner Weise von den Seren der übrigen Krankheitsgruppen unterscheiden.

Insgesamt zeigten 55 der 213 untersuchten Seren eine positive Myelinfluoreszenz, 51 Seren waren mit $+$ und 107 mit 0 zu bewerten.

2. Semiquantitative Bestimmung von Antikörpertiter positiver Seren:

Die Antikörpertiter von vier stark positiven Seren wurden in Verdünnungsreihen (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) mit maximal 1:64 ermittelt (bei gegebener Versuchsanordnung). Die Verlaufsbeobachtungen an 12 Seren waren negativ. In sämtlichen Fällen zeigten sich keine wesentlichen Titterschwankungen, d.h. weder eine Zu- noch eine Abnahme der Fluoreszenz.

3. Abbildung von Kaninchenhyperimmunseren gegen basisches Protein:

Im Gegensatz zu den menschlichen Seren bindet sich das Anti-BP-Serum auf Rückenmarksquerschnitten geradezu komplementär an den Strukturen in der weißen Substanz ab,

die von Humanseren nicht besetzt werden. Es kommt zu einer verwaschenen, überflutenden Fluoreszenz des Faserfilzes zwischen den Querschnitten der großen Nervenfasern. Die Markscheiden der quergetroffenen Nervenfasern selbst, Nervenzellen und Gefäße werden ausgespart. Besonders imponieren die dunklen Zellkörper der Motoneurone. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen zahlreicher Autoren überein (Lennon et al., 1971; Simon, 1971; Tomasi et al., 1968; Wickremesinghe et al., 1972; Field et al., 1963). Eine genaue Darstellung der Markscheiden bekommt man dagegen zum Beispiel mit Schnitten von Gehirnrinde, wo nur vereinzelt myelinisierte Fasern verlaufen, oder mit Präparaten aus den Vorderwurzeln. In den Vorderwurzeln des Rückenmarks kommt es im Gegensatz zur weißen Substanz zu einer ringförmigen Fluoreszenz der quergetroffenen Markscheiden (Simon, 1971; Tomasi et al., 1968).

4. Untersuchung von unverdünnten Seren gesunder Kaninchen:

Es werden dieselben Zielstrukturen angefärbt (!), wie bei den menschlichen Seren. (Abb. 4,5,6) Eine spezifische Fluoreszenz wurde nicht festgestellt.

5. Ausschluß unspezifischer Fluoreszenz des Konjugates:

Die Kontrollen waren bei den verwendeten Konjugaten immer negativ und zeigten lediglich die dunkelblaue Autofluoreszenz des Gewebes.

6. Ausschluß speziesspezifischer Unterschiede bei der Verwendung von tierischem Gewebe und Seren vom Menschen:

In Übereinstimmung mit der Literatur ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen menschlichem und tierischem Gewebe. Lediglich die Nervenzellen waren nicht mehr zu sehen und die Gefäßfluoreszenz fiel aus, was vielleicht ebenfalls auf postmortale Veränderungen zurückzuführen ist.

7. Blocktest:

Die Anti-BP-Seren waren unter gegebenen Bedingungen nicht in der Lage das fluoreszenzoptische Bild der Humanseren durch Besetzung äquivalenter Strukturen zu verändern.

8. Absorptionsversuche:

- a) Die Humanseren zeigten nur eine geringe Abschwächung in der Fluoreszenz der einzelnen Strukturen, die Anti-BP-Seren dagegen eine deutliche Verminderung der spezifischen Fluoreszenz.
- b) Die im Vergleich zur IgG-Konzentration zweifache Myelinmenge führte zu einer deutlichen Abschwächung der Fluoreszenz sämtlicher Strukturen bei den Humanseren. Die Anti-BP-Seren dagegen zeigten eine völlige Auslöschung der Fluoreszenz, d.h., daß keine spezifischen Antikörper gegen basisches Protein mehr vorhanden waren.
- c) Die im Leberhomogenat absorbierten Seren zeigten nahezu die gleiche Abschwächung in der Fluoreszenz der einzelnen Elemente, wie die myelinabsorbierten Seren. Lediglich die Fluoreszenz der Anti-BP-Seren wurde bei der Leberabsorption nicht ausgelöscht, sondern nur abgeschwächt und verfeinert.
- d) Auch die doppelte Myelinabsorption führte im Vergleich zur Leberabsorption nicht zu einer wesentlich stärkeren Auslöschung irgendeiner speziellen Struktur, die dann als Myelin betrachtet werden könnte.

9. Phasenkontrastmikroskopie: (Abb. 7)

Die kombinierte phasenkontrastmikroskopische und immunfluoreszenzoptische Untersuchung zeigt, daß sich die Humanseren an den Markscheiden der großen quergetroffenen Nervenfasern abbinden (im Gegensatz zu den Anti-BP-Seren).

In Abb. 1 sieht man deutlich die ringförmige Fluoreszenz des Myelins. Bei den angrenzenden, schwarz erscheinenden Aussparungen handelt es sich um fixationsbedingte Schrumpfräume. Auch die oft zackige Deformierung der Myelinscheiden ist auf Veränderungen durch die Fixation zurückzuführen. Die Myelinfluoreszenz zeigt morphologische Variationen (vergleiche Abb. 1 und Abb. 2). So findet man häufig eine ringförmige Fluoreszenz wie in Abb. 1 mit zentraler Aussparung entsprechend dem Axon. Abb. 2 zeigt dagegen zum Beispiel eine mehr tupferartige Fluoreszenz der Nervenfaserschnitte mit einem winzigen schwarzen Punkt im Zentrum.

Die Ursache für dieses Verhalten liegt, wie man phasenkontrastmikroskopisch sehen kann, im unterschiedlichen Aufbau der einzelnen Nervenfasern und deren Verteilung in der weißen Substanz des Rückenmarks. Bündel von Fasern mit dünnen Myelinscheiden und dicken Axonen (Abb. 1) liegen neben Bezirken, wo nur Fasern mit dicken Myelinscheiden und kaum sichtbaren Axonen verlaufen.

10. Histologie:

Grob morphologisch könnte man die fluoreszierenden Strukturen bei den Humanseren für Axone halten. Die Axonfärbungen jedoch, auch in Kombination mit der Phasenkontrastmikroskopie, lassen keine Übereinstimmung mit dem fluoreszenzoptischen Bild der Humanseren erkennen.

11. IgG-Isolation: (Abb. 8)

Die isolierte IgG-Fraktion in physiologischer Konzentration (1250mg/100ml) auf den Schnitt gebracht, verhält sich bei der Immunfluoreszenz genauso wie das Vollserum. Eine Konzentrationserhöhung des IgG auf 2400mg/100ml, führte zu keiner wesentlichen Verstärkung der Anfärbung.

12. Partigen:

Die Konzentrationsbestimmung von IgG bei sechs ausgewählten Seren ergab keinerlei Beziehung zwischen IgG-Konzentration und Stärke der Fluoreszenz (Tab. 2). Man sieht, daß es bei gleich niedrigen IgG-Konzentrationen zu stark positiven, sowie ganz schwachen Reaktionen mit den Zielstrukturen kommen kann.

D i s k u s s i o n

A. Myelinantikörper und multiple Sklerose

Der Nachweis von Myelinantikörpern und Antikörpern gegen andere Strukturen des ZNS in Humanseren deutet darauf hin, daß eine Autoimmunisierung nicht in jedem Fall mit einer Erkrankung gleichzusetzen ist. Der Versuch, das Auftreten positiver Antikörperbefunde bei den einzelnen Patienten mit ihrer Krankheit in Verbindung zu bringen, war erfolglos. Zwar kann man bei starker Hypoxämie (z.B. Herzinsuffizienz), Alkoholdelirien, multipler Sklerose, Encephalitiden und zerebralen Insulten mit einer Freisetzung von zerebralen Antigenen rechnen, was sich aber nicht unbedingt im Serum widerspiegeln muß.

Die Autoantikörperbildung kann man als eine Reaktion auf die Freisetzung körpereigener, nicht toleranter Antigene auffassen. Diese Autoantigene bilden mit den Autoantikörpern zusammen Komplexe, die im Verlauf weiterer Stoffwechselwege aus dem Körper beseitigt werden. Die Autoimmunisierungsvorgänge könnte man für Schutzmaßnahmen des Körpers vor eigenen, aber bisher dem Immunsystem unbekannten Antigenen halten. Andererseits aber erübrigen sich Schutzmaßnahmen, wenn man annimmt, daß freigesetzte potentielle Antigene enzymatisch abgebaut werden. Eine weitere Möglichkeit der Autoantikörperbildung liegt vor, wenn es durch eine Veränderung von körpereigenen Proteinen zur Entstehung von Autoantigenen kommt. Welche physiologische Bedeutung den in unserer Arbeit nachgewiesenen Autoantikörpern zukommt und wo die Grenze zur pathologischen Reaktion überschritten wird, ist unbekannt. Man könnte vielleicht die individuellen Unterschiede in der Reaktionsbereitschaft des Immunsystems gegen Autoantigene als unterschiedliche Disposition für entsprechende Autoimmunkrankheiten auffassen.

Die Ergebnisse unserer Arbeiten zeigen auch übereinstimmend mit Caspary et al. (1966), daß bei der MS im Gegensatz zur EAE keine humorale Immunreaktion gegen das basische Protein (encephalitogenes Antigen) aufzudecken ist. Diese Befunde geben zu folgenden Überlegungen Anlaß. Man könne annehmen, daß die negativen Resultate beim Nachweis von Antikörpern gegen basisches Protein bei der MS darauf beruhen, daß entweder die Antikörper sofort durch das Antigen geblockt werden, und diese Komplexe sich dem Nachweis mit den bisherigen Methoden entziehen oder die Antikörper am Zielort abgebunden werden und nicht mehr im Serum auftreten, wie das bei Autoaggressionen gegen die Niere der Fall ist (Rother, 1970), wo ein Nachweis von Antikörpern erst bei nierenfreien Patienten möglich war. Besonders Letzteres aber kann man angesichts der speziellen Ultrastruktur der Endstrombahn und der dadurch bedingten Filtrationsvorgänge im ZNS (Gardner, 1972) solange als unwahrscheinlich betrachten, wie es nicht zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke kommt.

Auch der Nachweis einer zellulären Immunreaktion gegen encephalitogene Antigene bei der MS verlief meistens negativ. Untersuchungen mit Hilfe des Lymphozytentransformationstestes führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (Dau und Peterson, 1970; Millar, 1971). Erst mit der von Bendixen und Soborg (1969) entwickelten antigenspezifischen Hemmung der Migration der menschlichen Blutleukozyten als einem in vitro Parameter der zellulären Immunität gelang es, eindeutige Aussagen zu machen. So konnten Strandgaard und Jörgensen (1972), sowie Behan, Feldmann und Kies (1972) die Migration der Makrophagen von MS-Patienten weder mit basischem Protein aus zentralem noch aus peripherem Myelin hemmen.

Die übereinstimmenden Aussagen hinsichtlich der humoralen und der zellulären Immunität bei der MS deuten darauf hin, daß die Rolle des basischen Proteins bei der EAE nicht ohne

weiteres auf die multiple Sklerose übertragen werden kann.

Ein wichtiger Unterschied der EAE zur multiplen Sklerose liegt ja darin, daß die EAE nur mit unphysiologischen Dosen von basischem Protein und unter Verwendung von Adjuvantien erzwungen werden kann. Das basische Protein gilt allgemein als schlechtes Antigen (Eylar, 1970; Carnegie, 1971). Daraus ergibt sich eine weitere mögliche Erklärung der Fehlschläge beim Nachweis einer Immunreaktion gegen das basische Protein bei der multiplen Sklerose. Eine primäre, unterschwellig verlaufende Reaktion gegen basisches Protein könnte als Trigger für eine Immunreaktion gegen eine Vielzahl von ZNS-Antigenen fungieren. Die isolierte Reaktion gegen basisches Protein würde somit von der ausgelösten Autoaggression gegen ein breites Spektrum von Antigenen überdeckt.

Zur Abrundung und näheren Erläuterung meiner Überlegungen möchte ich noch einige virologische Fakten anführen.

Während Suzuki et al. (1969) noch von negativen Befunden bei der elektronenoptischen Untersuchung von Gehirnbiospiematerial von MS-Patienten berichteten, konnten ter Meulen et al. (1972) trotz elektronenoptisch negativer Befunde mit Hilfe der Ko-Kultivation Parainfluenza-Typ-1 Viren im Gehirngewebe der MS-Patienten nachweisen. Field et al. fanden 1972 sogar direkt elektronenmikroskopisch paramyxovirus-artige Nucleocapside im Zytoplasma einiger Astrozyten. Auch Prineas (1972) konnte paramyxovirus-ähnliche Partikel im Gehirn von Patienten mit chronischer MS elektronenoptisch darstellen. Brody et al. (1971) fanden bei einer Untersuchung von 97 MS-Patienten höhere Virusantikörpertiter gegen Masern, Influenza Typ C, Herpes simplex, Parainfluenza 3, Mumps und Varizella-Zoster gegenüber Kontrollpersonen.

Ein viraler pathogener Effekt kann auf verschiedene Art und Weise zustande kommen. So kann das Virus direkt zytotoxisch wirken, wie z.B. bei der Poliomyelitis (Simon et al. 1970) und zu einem Untergang der betroffenen Zelle führen.

Man könnte sich einen direkten viralen Befall von Gliazellen im ZNS vorstellen, in dessen Gefolge es zu einer Zerstörung der Markscheiden käme. Dies ist aber schon allein an Hand der lichtmikroskopischen Befunde der MS auszuschließen, da bei einem direkten zytoziden Angriff der Viren die Läsionen nicht an Gefäße gebunden wären, sondern entsprechend dem Ausbreitungsmodus der Infektion willkürlich verteilt wären.

Ultrastrukturell kann man bei der Poliomyelitis sehen, wie die Morphogenese der Viruspartikel im Zellkern beginnt. Beim Herpes-Virus dagegen versammeln sich und reifen die Partikel an den Membranen des Zellkerns oder des endoplasmatischen Retikulums, beim Masern-Virus an der Zelloberfläche. Man kann sehen wie die Partikel von Membrankomponenten eingehüllt sind (Mannweiler, 1969). Diese Viren verursachen in vitro nur relativ milde und langsam fortschreitende zytopathische Veränderungen.

Jedes Virus, das in eine Zelle eindringen will, muß die Zellmembran überwinden. Dasselbe geschieht, wenn es die Zelle wieder verläßt, außer, dies vollzieht sich durch völlige Zerstörung der Zelle, wie es aber bei Herpes und Masern nicht der Fall ist. Das Durchdringen der Zellmembran führt an dieser zu einer lokalen Veränderung der antigenen Strukturen und somit zu einer veränderten immunologischen Reaktion. Watson und Wildy (1963) konnten weiterhin zeigen, daß zum Beispiel das von Zellmembran umhüllte Herpesvirus auch mit Antikörpern reagiert, die spezifisch gegen die Wirtszelle gerichtet sind, nicht dagegen die nackten Nucleocapsidstrukturen. Hier bietet sich die Gelegenheit, eine Erklärung für die Immunisierung des Organismus gegen sein eigenes Gewebe zu finden.

Die Masernviren nehmen beim Verlassen der Zelle eine Anzahl von wirtsspezifischem Antigen mit. Daraufhin kommt es zu einer Antikörperproduktion gegen Virus und gegen Antigene der Zellmembran. Diese Antikörper können ihrer-

seits wieder mit den Wirtszellen der Viren immunologisch reagieren z.B. mit den Gliazellen.

Bei der Infektion mit Masernvirus bietet sich eine weitere Möglichkeit der Interpretation eines virologisch-immunologischen Prozesses an der Zelle an. Mit dem Elektronenmikroskop kann man sehen, daß oft Partikel, die sich noch nicht von der Zellmembran abgelöst haben, also noch mit ihr verbunden sind, schon morphologisch definierte virus-spezifische Eigentümlichkeiten besitzen (Mannweiler, 1969). Ein verzögertes Loslösen solcher Partikel von der Zelloberfläche würde heißen, daß für eine gewisse Zeit Antigen exponiert ist. Diese Zellen würden dann nach Mannweiler (1969), mit spezifisch gegen die Viruspartikel gerichteten Antikörpern und mit Komplement zerstört werden.

Der Verdacht, daß Masernviren möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese der MS spielen, stützt sich vornehmlich auf Befunde, die einen erhöhten Masernvirusantikörpertiter bei MS-Patienten gegenüber gesunden Personen zeigen (Adams, 1967; E. Pette et al., 1969). Die Theorie einer möglichen pathogenetischen Beziehung zwischen Maserninfektion und MS stammt von E. Pette und Kuwert (1965).

Diese Theorie einer persistierenden Masern-Virus-Infektion hat sich zwar als richtig erwiesen, jedoch nicht direkt im Hinblick auf die MS. Connolly et al. (1967), Dayan et al. (1967) und Ebinger et al. (1971) fanden hohe Masernantikörpertiter im Serum und im Liquor von Patienten, die an einer subacuten, sklerosierenden Panencephalitis (SSPE) erkrankt waren, außerdem konnte Dayan (1971) Masern-Virus-Antigene in Liquorzellen von SSPE-Patienten immunfluoreszenz-mikroskopisch nachweisen. Im Hirngewebe läßt sich Masernantigen in freier Form (Connolly et al., 1967; Freeman et al., 1967; Lennette et al., 1968) oder gekoppelt an Masernantikörper in Gegenwart von Komplement nachweisen (ter Meulen et al., 1969).

Ob bei der multiplen Sklerose eine persistierende Virusinfektion bzw. eine Slow-Virus-Infektion vorliegt oder nicht, und in welchem Ausmaß immunologische Vorgänge eine Rolle spielen muß Aufgabe weiterer Untersuchungen sein.

B. Spezifität und Unspezifität der Nachweismethode:

Die kontroversen Befunde der einzelnen Untersucher lassen sich durch Verschiedenheiten in der Ausführung der indirekten Immunfluoreszenz erklären. So verwenden Edgington und Dalessio (1970) z.B. unverdünnte Konjugate, was zu direkten unspezifischen Interaktionen mit dem Schnittgewebe führt (Jentzsch, 1967; Nairn, 1969).

Bei der Absorption von Humansen mit Myelin ist auffallend, daß es nicht zu einer völligen Auslöschung der Fluoreszenz, wie bei den Anti-BP-Seren kommt. Allerdings ist zur Erlangung desselben Abschwächungseffektes bei der Myelinabsorption nur ein Arbeitsgang und eine wesentlich geringere Menge nötig, als bei der Leberabsorption. Offenbar hat Myelin eine stärkere Affinität zu Serumbestandteilen als Leberhomogenat, woraus ein höherer Verdünnungseffekt resultiert. Zur Klärung der Frage, warum es im Falle myelinpositiver Humansen nicht zu einer völligen Absorption, wie bei den Anti-BP-Seren kommt, bieten sich folgende Überlegungen an:

- 1) Bei den Humansen handelt es sich nicht um Anti-BP-Antikörper, sondern wahrscheinlich um Antikörper gegen andere Antigene der Markscheiden. Es bestehen somit biochemische Unterschiede, die sich möglicherweise auch auf das biologische Verhalten der Antikörper auswirken (Affinität).
- 2) Bei der Verwendung unverdünnter Humansen besteht die Möglichkeit unspezifischer und spezifischer Interaktionen, die sich in unterschiedlichem Ausmaß kombinieren und überlappen können.

- 3) Die Myelinlösung zeigt auf Grund unspezifischer physiko-chemischer Mechanismen eine andere Affinität zu bestimmten Serumbestandteilen als Leberhomogenat (im Gegensatz zu spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktionen).
- 4) Weiterhin läßt sich eine Schädigung korrespondierender Myelinantigene bei der Isolierung des Myelins diskutieren.

Die Ergebnisse mit isoliertem IgG und der IgG-Konzentrationsbestimmung (Partigen) sprechen dafür, daß es sich bei den fluoreszenzoptisch als positiv bewerteten Befunden um die spezifische Abbindung von Anti-Myelin-Antikörpern vom IgG-Typ handelt.

Folgende mögliche Erklärungen kommen in Betracht:

- 1) Die IgG-Fraktion ist eine inhomogene Population. Eventuell spezifische Antikörper können bei niedrigem Gesamt-IgG in relativ hohen Konzentrationen vorliegen und sich spezifisch abbinden.
- 2) Man könnte sich aber auch vorstellen, daß eine bestimmte Population der IgG-Fraktion, deren Konzentration in verschiedenen Seren unterschiedlich ist, sich unspezifisch abbindet, und somit zu denselben Ergebnissen führt. Dieser Fall ist praktisch nicht zu erfassen.
- 3) Wenn jedes IgG-Molekül dieselbe Fähigkeit zur unspezifischen Abbindung hätte, müßte im Idealfall die Intensität der unspezifischen Anfärbung mit der IgG-Konzentration korreliert sein (wenn man alle anderen äußeren Einflüsse außer Betracht läßt!).

Daß man mit einer gewissen Unspezifität durch die Affinität von IgG zu verschiedenen Strukturen, wie z.B. Bindegewebe, rechnen muß, ist bekannt (Jentzsch, 1967; Nairn, 1969). Dafür sprechen auch: 1. Die regelmäßige schwach dunkelgrüne Anfärbung der erwähnten Strukturen bei den untersuchten

Humanseren. 2. Die Befunde bei unverdünnten Anti-EP-Seren, wo es außer der charakteristischen EP-Fluoreszenz zu einer matten dunkelgrünen Anfärbung der quergetroffenen Markscheiden und der Motoneurone kommt. 3. Die Ergebnisse mit Seren von gesunden Kaninchen. Die Fluoreszenz oder Anfärbung bestimmter Strukturen kann also aus folgenden Faktoren, einzeln oder in Kombination, zusammengesetzt sein:

- 1) Spezifische Abbindung von spezifischem IgG (Anti-Myelin-Antikörper).
- 2) Unspezifische Anheftung von IgG.
- 3) Spezifische Abbindung von unspezifischen IgG-Molekülen (kreuzreagierende Antikörper).

Eine Vermeidung der Unspezifität (Punkt 2 und 3) ist durch Verdünnung und/oder Absorption der Seren in Leberhomogenat möglich. Eindeutig positive Befunde sind aber auch ohne Verdünnung der Seren sicher zu erkennen. Da man nicht beurteilen kann, inwieweit es sich bei schwacher Fluoreszenz oder Anfärbung um niedrige Antikörpertiter oder um unspezifische Effekte handelt, geht eine Verdünnung der Seren auf Kosten eventuell positiver Befunde. Zumal die Höhe der Verdünnung nicht genau mit dem Maße der Unspezifität korreliert werden kann. Daher kann man auch bei der Myelinabsorption nicht mit letzter Sicherheit entscheiden, ob die verbleibende Anfärbung (Befund z.B. $\pm$) auf spezifische oder unspezifische IgG-Abbindung zurückzuführen ist.

Warum sich die Myelinantikörper in den Humanseren nur an den Markscheiden der großen Nervenfasern, die Anti-BP-Antikörper dagegen nur an den dünnen Fasern abbinden, ist ungeklärt. Offenbar sind in den großen Myelinscheiden die Determinanten für Anti-BP-Antikörper nicht zugänglich. Vielleicht spielen örtliche Unterschiede im ultrastrukturellen Aufbau des ZNS eine Rolle. Eine Lösung dieser Frage bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

L i t e r a t u r

- Adams, J.M.: Measles antibodies in patients with multiple sclerosis *Neurology* 17,707-710 (1967).
- Allerand, C.D, Yahr, M.D.: Gamma-Globulin affinity for normal human tissue of the Central Nervous System. *Science*, 144, 1141-1142 (1964).
- Bendixen, G., Sjöborg, M.: A leucocyte migration technique for in vitro detection of cellular (delayed type) hypersensitivity in man. *Dan. med. Bull.* 16,1 (1969).
- Berg, O., Källen, B.: Gliotoxic effect of serum from patients with neurological diseases. *Lancet*, 1,1051 (1962).
- Bornstein, M. B., Appel, S. H.: Tissue culture studies of demyelination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 122,280-286 (1965).
- Brody, J. A., Sever, J. L.: Virus antibody titers in multiple sclerosis Patients, siblings, and controls. *J. Amer.med.Ass.* 216,1441-1446 (1971).
- Carnegie, P. R.: Properties, structure and possible neuro-receptor role of the encephalitogenic protein of human brain. *Nature* 229,25-28 (1971).
- Caspary, E. A., Sinden, R. E., Field, J.: Precipitating antibody in MS and EAE. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 29, 103-106 (1966).
- Connolly, J. H., Allen, I. V., Hurwitz, L. J., Millar, J. H. D.: Measles virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* 1,542 (1967).
- Dau, P. C., Peterson, R. D. A.: Transformation of lymphocytes from patients with MS. *Arch. Neurol.* (Chic.) 23,32-40 (1970).
- Dayan, A. D.: Immunofluorescent detection of measles virus antigens in cerebrospinal fluid cells in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* 2,391 (1971).

- Dayan, A. D., Gostling, J. V. T., Graeves, J. L., Stevens, D. W., Woodhouse, M. A.: Evidence of a pseudomyxovirus in the brain in subacute sclerosing leucoencephalitis. *Lancet* 1,980 (1967).
- Dowling, P. C., Kim, S. U., Murray, M. R.: Serum 19S and 17S demyelinating antibodies in multiple sclerosis. *J. Immunol.* 101,1101-1104 (1968).
- Ebinger, G., Matthyssens, G.: Cerebrospinal fluid measles antibody titer and gamma-globulins in subacute sclerosing panencephalitis. *Z. Neurol.* 200,1-5 (1971).
- Edington, T. S., Dalessio, D. J.: The assessment by immunofluorescence methods of humoral anti-myelin antibodies in man. *J. Immunol.* 105, 248-255 (1970).
- Eylar, E. H.: Amino acid sequence of the basic protein of the myelin membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences* Vol. 67, No. 3, 1425-1431 (1970).
- Feldman, R. G., Behan, P. O., Kies, M. W.: Cell-mediated hypersensitivity to neural antigens. *Arch. Neurol.* 27, 145-152 (1972).
- Field, E. J., Ridley, A., Caspary, E. A.: Specificity of human brain and nerve antibody as shown by immunofluorescence microscopy. *Brit. J. exp. Path.* 44, 631-634 (1963).
- Field, E. J., Cowshall, S., Narang, H. K., Bell, T. M.: Viruses in multiple sclerosis? *Lancet* 2, 280-281 (1972).
- Freeman, J. M., Maggoffin, R. L., Lennette, E. H., Herndon, R. M.: Additional evidence of the relation between subacute inclusionbody encephalitis and measles virus. *Lancet* 2,129 (1967).
- Frick, E.: Zur Serologie der multiplen Sklerose, *Klin. Wschr.* 32, 450 (1954).
- Gardner, W. J.: The Plasma Protein Barriers. *J. neurol. Sci.* 15,1-12 (1972).
- Hughes, E., Field, E. J.: Myelinotoxicity of serum and spinal fluid in multiple sclerosis; a critical assessment. *Clin. Exper. Immunol.* 2, 295 (1967).

- Jentzsch, K. D.: Immunfluoreszenz in der medizinischen Mikrobiologie. Leipzig: Johann Ambrosius Barth 1967.
- Joustra, M., Lundgren, H.: In: 17th. Annual Colloquium "Protides of the Biological Fluids", Brugge, 17, 511-515 (1969).
- Kelemen, J.: Methode zur Imprägnation des in Paraaffin eingebetteten Nervengewebes. Acta neuropath. 4, 431-435 (1965).
- Lennette E. H., Maggoffin, R. L., Freeman, J. M.: Immunology evidence of measles virus as an etiologic agent in subacute sclerosing panencephalitis. Neurology 18,21 (1968).
- Lennon, V. A., Whittingham, S., Carnegie, P. R., McPherson, T. A., Mackay, I. R.: Detection of antibodies to the basic protein of human myelin by Radioimmunoassay and Immunofluorescence. J. Immunol. 107, 56-62 (1971).
- Macleod, J., Ridley, A. R., Smith, C., Field, E. J.: Failure to demonstrate circulating antibodies to alcoholic brain extracts in multiple sclerosis. Brit. med. J. 1, 1525 (1962).
- Mannweiler, K.: Cytologic ultrastructural considerations and studies of the pathogenesis of demyelinating processes. In: Pathogenesis and Etiology of Demyelinating Diseases. Add. ad Int. Arch. Allergy, 36, 41-54 (Karger, Basel/New York 1969).
- Mc Alpine, D., Lumsden, C. E., Acheson, E. D.: Multiple Sclerosis. A Reappraisal. Edinburgh & London: E & S Livingstone LTD (1968).
- Millar, J. H. D.: Multiple Sclerosis. A disease acquired in childhood. Springfield, Illinois, USA: Charles C. Thomas 1971.
- Nairn, R. C.: Fluorescent Protein Tracing. Edingburgh & London: E & S Livingstone LTD 1969.
- Pette, E., Palacios, O.: The possible role of measles virus in the pathogenesis of multiple sclerosis.

- In: Pathogenesis and Etiology of Demyelinating Diseases. Add. ad Int. Arch. Allergy, 36, 102-108 (Karger, Basel/New York 1969).
- Pette, E. Kuwert, E.: Evaluation of multiple sclerosis sera against measles antigen in the complement fixation test. Arch. ges. Virusforsch. 16, 141 (1965).
- Princeas, J.: Paramyxovirus-like particles associated with acute demyelination in chronic relapsing multiple sclerosis. Science 178, 760-763 (1972).
- Ritzel, G., Wüthrich, R., Rieder, H. P.: Zur Frage der Antikörper gegen Nervengewebe in Serum und Liquor von Multiple-Sklerose-Kranken. Schweiz. med. Wschr. 93, 1336-1339 (1963).
- Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München-Wien: R. Oldenbourg 1968.
- Rother, K.: Autoaggression gegen Niere. Med. Welt 21, 1029-1035 (1970).
- Sachs, H., Steiner, G.: Serologische Untersuchungen bei der multiplen Sklerose. Klin. Wschr. 13, 1714 (1934).
- Simon, J., Peters, G., Blinzinger, K., Boulger, L., Magrath, D.: Neue Gesichtspunkte zur Frage der Entstehung und der pathogenetischen Bedeutung der entzündlichen Reaktion bei Virusinfektionen des ZNS. Arch. Psychiat. Nervenkr. 213, 301-326 (1970).
- Simon, J., Simonova, O.: Die organischen und funktionellen Störungen bei der EAE des Rhesus-Affen. Z. Neurol. 200, 105-121 (1971).
- Strandgaard, S., Jørgensen, P. N.: Delayed hypersensitivity to myelin antigen in MS investigated with the Leucocyte Migration Method. Acta Neurol. Scand. 48, 243-248 (1972).
- Suzuki, K., Andrews, J. M., Waltz, J. M., Terry, R. D.: Ultrastructural studies of multiple sclerosis. Lab. Invest. 20, 444-454 (1969).
- ter Meulen, V., Koprowski, H., Iwasaki, Y., Käckell, J. M., Müller, D.: Fusion of cultured multiple-sclerosis brain cells with indicator cells: presence of nucleocapsids and virions and isolation of parainfluenza-

- type virus. *Lancet* 2, 1-5 (1972).
- ter Meulen, V., Müller, D., Enders-Ruckle, G., Joppich, G.: Immunohistological, microscopical and neurochemical studies on encephalitides. 3. Subacute progressive panencephalitis. Virological and immunohistological studies. *Acta neuropath.* 12, 244 (1969).
- Tomasi, L. G., Kornguth, S. E.: Characterisation and immunochemical localisation of a basic protein from pig brain. *J. Biolog. Chem.* 243, 2507-2513 (1968).
- Watson, D. H., Wildy, P.: Some serological properties of herpes virus particles studied with the electron microscope, *Virology* 21, 100-111 (1963).
- Wickremesinghe, H. R., Yates, P. O.: Immunological properties of normal neural tissues. *J. neurol. Sci.* 15, 225-242 (1972).
- Wilkinson, G. C., Zeromski, J.: Immunofluorescent detection of antibodies against neurones in sensory carcinomatous Neuropathy. *Brain* 88, 529-538 (1965).

Z u s a m m e n f a s s u n g

56 Seren von Patienten mit multipler Sklerose und 157 Seren von Patienten anderer Krankheitsgruppen wurden immunfluoreszenzoptisch auf das Vorkommen von Hirnantikörpern untersucht. Dabei wurden die Zielstrukturen der humoralen Antikörper mit Hilfe von Phasenkontrastmikroskopie, Blocktesten, Absorptionsversuchen und normaler Histologie ermittelt, und die Verteilung positiver Antikörperbefunde bei den verschiedenen Patientengruppen in Beziehung zur multiplen Sklerose gesetzt. IgG-Isolierung und IgG-Konzentrationsbestimmungen wurden zur Objektivierung der Befunde durchgeführt, unspezifische Phänomene diskutiert.

Die nachgewiesenen Antikörper waren gegen Myelinbestandteile gerichtet, aber nicht gegen das basische Protein der Markscheiden. Bei den MS-Patienten konnte keine Häufung positiver Befunde festgestellt werden. Das Auftreten von Autoantikörpern war nicht an bestimmte Diagnosen gebunden.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Peters, in dessen Abteilung ich arbeiten konnte.

Herrn Dr. med. J. Simon bin ich für die Überlassung des Themas sowie für die wohlwollende Förderung meiner Untersuchungen zu tiefstem Dank verpflichtet.

Ich danke Herrn Dr. med. J. Simon für die Überlassung von Anti-BP-Seren, Herrn Dr. med. H. Demus und Herrn Dr. med. E. Mehl für die Isolation von Myelin. Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Schrader für die Bereitstellung von Seren aus der neurologischen Klinik Ebenhausen bedanken.

Frl. Helga Lorenzen danke ich für die hervorragende technische Assistenz.

Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med.
G. Peters, in dessen Abteilung ich arbeiten
konnte.

Herrn Dr. med. J. Simon bin ich für die Überlassung des
Themas sowie für die wohlwollende Förderung meiner Unter-
suchungen zu tiefstem Dank verpflichtet.

Ich danke Herrn Dr. med. J. Simon für die Überlassung
von Anti-BP-Seren, Herrn Dr. med. H. Demus und Herrn Dr.
med. E. Mehl für die Isolation von Myelin. Ferner möchte
ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. A. Schrader für die
Bereitstellung von Seren aus der neurologischen Klinik
Ebenhausen bedanken.

Frl. Helga Lorenzen danke ich für die hervorragende tech-
nische Assistenz.

Die Untersuchungen wurden durch die Deutsche Forschungs-
gemeinschaft unterstützt.

L e b e n s l a u f

=====

Am 16. Oktober 1947 wurde ich als Sohn des damaligen Studienrates Johann von Schmädel und seiner Ehefrau Elisabeth in Bayreuth geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Fürstenfeldbruck und anschließend das mathematisch - naturwissenschaftliche Gymnasium in Fürstenfeldbruck. Hier bestand ich 1967 die Reifeprüfung.

Im Wintersemester 1967/68 wurde ich an der medizinischen Fakultät der Universität München immatrikuliert. Am 6. Okt. 1970 bestand ich dort das Physikum. Im Februar 1971 begann ich neben den klinischen Studien mit meiner Doktorarbeit im Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München. Am 13. Dezember 1973 legte ich die ärztliche Prüfung ab.

Seit 2. Januar 1974 bin ich in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Nabburg als Medizinalassistent tätig.

Tabelle 1

Patienten	Anzahl der Seren	Bewertung der Myelinfluoreszenz		
		positiv in Prozent	±	0
MS-Patienten	56	13 = 23%	20	23
Neurol. Pat.	79	15 = 19%	11	53
Interne Pat.	35	11 = 31%	12	12
Schizophrene	17	10 = 59%	-	7
Alkoholiker	15	5 = 33%	6	4
Gesunde Pers.	11	1 = 9%	2	8
	Gesamtsumme der Seren			
	213	55 = 26%	51	107

Tab. 1: Die Verteilung von Myelinantikörpern in verschiedenen Krankheitsgruppen.

Tabelle 2

Diagnose	IgG-Konz. (mg/100ml)	Myelin
MS	704	++
SSPE	640	0
gesund	1296	±
gesund	1296	++
Alkohol	640	0
Alkohol	960	+++

Tab. 2: IgG-Konzentrationsbestimmung und Myelinantikörper.

